

肿瘤 pH 响应的聚合物胶束用于肿瘤药物靶向输送的研究进展

许金霞¹, 唐建斌², 赵鲁杭^{1*}, 申有青^{2*}

(1. 浙江大学医学院生化与遗传系, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江大学化学工程与生物工程系, 浙江 杭州 310027)

摘要: 本文综述了肿瘤 pH 响应的聚合物胶束 (pH-responsive polymeric micelles) 靶向输送抗癌药物的研究进展。肿瘤组织的细胞间质呈弱酸性 (pH < 7), 而肿瘤细胞内的内涵体和溶酶体具有更强的酸性 (pH 4~6)。pH 响应的聚合物胶束的内核或外壳在肿瘤酸性 pH 下能发生质子化或快速化学反应, 导致其物理性能发生改变。胶束对肿瘤酸性 pH 的响应功能可以用来实现药物的快速释放、激活胶束的靶向功能、促进胶束的细胞内吞, 以及促使胶束从溶酶体逃逸到细胞质溶质 (cytosol) 中, 并靶向细胞核等细胞器。大量的体内和体外实验表明, pH 响应型胶束输送抗癌药物可以明显增加药物在作用部位如细胞质和细胞核中的浓度, 饱和癌细胞的多种抗药机制, 从而克服肿瘤细胞的耐药性, 提高抗癌药物的治疗效率并减少其毒副作用。

关键词: pH 响应; 聚合物; 胶束; 肿瘤; 药物输送系统; 纳米医学; 化学治疗

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 12-1328-08

Advances in the study of tumor pH-responsive polymeric micelles for cancer drug targeting delivery

XU Jin-xia¹, TANG Jian-bin², ZHAO Lu-hang^{1*}, SHEN You-qing^{2*}

(1. Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: This review presents the state of the art of pH-responsive polymeric micelles for cancer drug delivery. Solid tumors have a weakly acidic extracellular pH (pH < 7), and cancer cells have even more acidic pH in endosomes and lysosomes (pH 4-6). The pH-gradients in tumor can be explored for tumor targeting and drug release in cancer drug delivery by applying pH-responsive polymeric micelles. The pH-responsive polymeric micelles consist of a corona and a core, and are made of amphiphilic copolymers, in which there are pH-responsive polymeric blocks. Two types of pH-responsive polymers-protonizable polymers and acid-labile polymers have been mainly used to make pH-responsive micelles for drug delivery. The protonizable polymers are polybases or polyacids, and their water-soluble/insoluble or charge states undergo changes with the protonation or deprotonation stimulated by external acidity, while the acid-labile polymers change their physical properties by chemical reaction stimulated by the acidity. Polymeric micelles whose core or coronas respond to the tumor extracellular acidity can be explored for triggering the fast release of the carried drug, activating the targeting group and accelerating the endocytosis of drug-loaded polymeric micelles, and those whose core or coronas respond to the tumor lysosomal acidity can be used for facilitating their escape from the lysosomes and targeting the nucleus. Various *in vivo* and *in vitro* experiments demonstrated that pH-responsive polymeric micelles are effective for cellular targeting, internalization, fast drug release and nuclear localization, and hence enhancing the therapeutic efficacy and reducing the side effect of cancer chemical therapy.

Key words: pH-responsive; polymer; micelle; neoplasm; drug delivery system; nanomedicine; chemotherapy

收稿日期: 2009-04-24.

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (50888001).

*通讯作者 Tel: 86-571-88208237, Fax: 86-571-87953993, E-mail: zhaoluhang@263.net, shenyq@zju.edu.cn

1 前言

癌症严重危害着人类的生命健康。据世界卫生组织统计, 2005 年全世界有 760 万人死于癌症, 估计 2015 年将达到 900 万, 2030 年达到 1150 万。癌症已被列为人类面临的“第二号杀手”(仅次于心血管病)^[1]。化学治疗是除手术外最重要的治疗手段, 主要存在两大问题: 一是药物的毒副作用。接受化疗的癌症病人往往出现白细胞、红细胞及血小板数量的减少, 恶心、呕吐以及脱发等副作用, 甚至危及生命^[2]。二是肿瘤(癌细胞)的耐药性。尽管大多数癌症病人在化疗初期对药物有所反应, 但最终肿瘤的耐药性机制往往导致了化疗的失败、病人死亡^[3]。如何利用药物输送手段提高药物的肿瘤靶向性能, 并克服肿瘤细胞的耐药性一直是肿瘤药物输送研究者面临的挑战。目前, 研究者们对多种肿瘤药物靶向输送技术包括磁介导、配体-受体作用、pH 介导药物输送进行了广泛的研究, 并取得了很好的研究进展。有关配体-受体作用、磁介导肿瘤药物输送已有系统的综述可供参考^[4-6]。本文将介绍有关 pH 介导的聚合物纳米胶束输送抗癌药物的最新研究进展。

近年来, 利用聚合物胶束输送抗癌药物来提高药物的肿瘤靶向性能与克服肿瘤细胞耐药性引起了广泛的研究兴趣^[7, 8]。聚合物胶束由疏水的内核和亲水的外壳组成, 尺寸在几十到几百个纳米之间, 其疏水内核能包埋各种疏水性药物, 如顺铂、多柔比星、喜树碱及紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 等。亲水性外壳通常是由聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 组成, 它能使胶束逃过网状内皮系统 (reticuloendothelial system, RES) 的识别与扑捉, 从而在血液循环系统中有足够长的保留时间, 以通过肿瘤的高通透和滞留效应 (enhanced permeability and retention, EPR) 被动聚集在肿瘤组织^[9]。另外, 通过引入叶酸 (folate)、促黄体生成素释放激素等肿瘤靶向基团^[10], 或者与磁性纳米颗粒结合^[11], 使胶束具有主动肿瘤靶向能力。因此利用胶束输送药物可明显增加药物的生物利用度, 显著增加药物的抗癌能力和减少其毒副作用。You 等^[12]利用改性壳聚糖齐聚物制备了叶酸介导的纳米胶束, 使其负载抗癌药物 PTX, 发现该纳米胶束负载的 PTX 与单纯的 PTX 相比, 对人肺癌 A549 细胞和人宫颈癌 HeLa 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别从 7.0 和 11.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 降至 0.32 和 0.268 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

克服肿瘤细胞内的多种抗药机制, 仍是肿瘤化疗面临的难题。目前研究发现, 利用能响应肿瘤酸性

的智能聚合物胶束输送抗癌药物可能是解决这一难题的途径之一。肿瘤 pH 可用于触发纳米载体的快速药物释放、输送药物到细胞内甚至特定的细胞器, 大量增加药物作用部位如细胞质和细胞核中的浓度, 饱和癌细胞的多种抗药机制, 克服肿瘤的耐药性, 减少肿瘤化学治疗的毒副作用^[13, 14]。本文就这一研究热点进行简述。

2 肿瘤内部的酸性环境

实体瘤内部存在不同的酸性环境, 包括细胞间质中的弱酸性环境 (extracellular pH, pH_E)、癌细胞中内涵体和溶酶体中更强的酸性环境。正常组织的 pH 值一般为 7.4。实体瘤内部的缺氧状态使肿瘤细胞无氧糖酵解产生乳酸, 而肿瘤内部血管系统的缺乏使产生的乳酸不能充分排出, 导致肿瘤内呈酸性^[15]。用电子及化学探针等方法测量肿瘤内 pH_E 在 5.7~7.8, 均值为 7.06^[16]。肿瘤细胞中早期内涵体的 pH 值在 6.0 左右^[17, 18], 有的甚至低于 5.4^[18], 而晚期内涵体的 pH 值一般在 5.0 左右^[19]。溶酶体 (lysosome) 的 pH 值 (pH_L) 更低 (4.0~5.0)^[20]。肿瘤中的这些酸性环境可以作为信号用于触发载药胶束的快速药物释放、细胞内吞胶束及其细胞器靶向。

3 pH 响应的聚合物胶束的构成

pH 响应的聚合物胶束主要是通过双亲的嵌段或者接枝共聚物自组装形成胶束制备而成。共聚物中含对 pH 响应的聚合物链段。pH 响应的聚合物链段可以分成两类: 质子化的聚合物和酸不稳定的聚合物。

质子化的聚合物是带胺基、吡啶或者咪唑基等碱性基团的弱碱性聚合物或带羧酸基团的弱酸性聚合物。当 pH 发生改变时, 这类聚合物的离子化状态发生改变, 导致它们在水中的溶解性发生变化。聚 (N,N-二乙基胺基乙基甲基丙烯酸酯) [poly(N,N-diethylaminoethyl methacrylate), PDEA]^[21]、聚 (4-或-2-乙烯基吡啶) [poly(4- or 2-vinylpyridine), PVP]^[22]、聚组氨酸 [poly(L-histidine), PHis]^[23] 和聚 (β-胺基酯) [poly(β-amino ester), PbAE]^[24] 是最常用的弱碱性聚合物 (图 1)。这些聚合物在碱性和中性条件下不溶于水, 而在酸性条件下, 由于碱性基团发生质子化而带有正电荷, 使聚合物溶于水。带羧基的弱酸性聚合物主要是聚 (2-烷基丙烯酸), 如聚 (2-甲基丙烯酸)^[25]、聚丙烯酸^[26]、聚 (2-乙基丙烯酸) 和聚 (2-丙基丙烯酸)^[27]。与弱碱性的聚合物不同, 它们在酸性条件下质子化后不溶于水, 而在碱性条件下溶于水。这些弱碱性或弱酸性的聚合物从溶解到不溶解的相转变 pH

(pH_T) 均可通过调整它们的疏水取代基团改变^[28]。从肿瘤内存在的酸性环境看, 适用于抗癌药物输送的 pH 响应聚合物的 pH_T 须在 4.0~7.0。

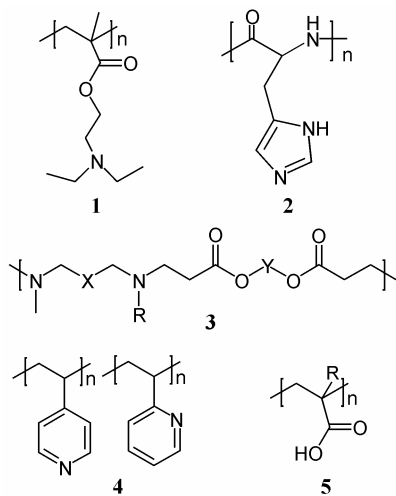


Figure 1 Chemical structures of pH-responsive polybases and polyacids. 1: Poly(*N,N*-diethylaminoethylmethacrylate) (PDEA); 2: Poly(*L*-histidine) (PHis); 3: Poly(4- or 2-vinylpyridine) (PVP); 4: Poly(β -amino ester) (PbAE); 5: Poly(2-substituted acrylic acid)

另一类用于制备 pH 响应纳米胶束的聚合物是酸不稳定聚合物。它们在弱酸性环境中能快速水解, 实现从疏水到亲水性的转变。如图 2 所示, Bae 等^[29]用能快速水解的脲键把疏水的阿霉素 (adriamycin, ADR or doxorubicin, DOX) (化合物 6) 连接到亲水的 PEG-聚冬氨酸的嵌段共聚物 (化合物 7) 上, 形成键合物 (化合物 8), 使得聚冬氨酸链段变成疏水链段。双亲的嵌段共聚物在中性条件下形成胶束。但在 pH 5.0 左右的酸性溶液中, 脲键断裂, 聚合物变为亲水而导致胶束溶解, 释放出药物。聚己内酯 (polycaprolactone, PCL) 和聚 *L*-乳酸[poly(*L*-lactic acid), PLLA]等可降

解聚合物, 尽管在酸性条件下能够水解, 但它们的水解速度太慢, 不能用作 pH 响应的链段。目前常用的在酸性条件下快速水解的化学键有脲键^[29, 30]、乙二缩醛键^[31, 32]、 β -羧酸酰胺键^[33]、原酸酯键^[34]等。

4 肿瘤 pH 响应的聚合物胶束在输送抗癌药物上的应用

4.1 肿瘤 pH_E 引发的药物释放 实体瘤的细胞外间质 pH_E 一般是 7.06。因此在生理条件下 (pH 约 7.4) 稳定而在 pH_E 下解体的胶束, 可以用来输送抗癌药物到肿瘤间质液。Lee 等^[35]制备了一种 pH_E 响应的 PEG-b(block)-Phis 胶束, 用来输送抗癌药物到肿瘤间质液。由于 PHis 链段不溶于 pH 7.4 的水溶液, 因此形成疏水内核装载包埋 DOX。当这种胶束进入弱酸性的肿瘤组织时, PHis 链段由于质子化而溶于水, 胶束解体, 包埋其中的 DOX 被释放到肿瘤间质液。研究发现, 在不同 pH 值下这种胶束表现出不同的 DOX 释放行为。在 pH 低于 7.0 的溶液中, DOX 的释放速率比在 pH 7.4 和 8.0 的溶液中明显加快^[36, 37]。

Ko 等^[38]制备了 PEG-b-PbAE 嵌段共聚物, 这种嵌段共聚物能形成以疏水并对 pH 敏感的 PbAE 为内核, PEG 为亲水壳, 包埋疏水抗癌药物 DOX 的胶束。此胶束的 pH_T 在 6.4~7.4。酸性条件下 PbAE 的质子化使胶束解体而释放所携带的药物。实验结果表明, 与仅使用 DOX 相比, 这种 pH 响应的胶束携带的 DOX 更能抑制小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞的生长, 体内实验结果表明使用该胶束负载 DOX 与直接使用 DOX 相比, 持续给药 3 周后荷瘤小鼠体内肿瘤体积降低 62%, 同时能延长荷瘤鼠的生存时间。

4.2 pH_E 引发聚合物胶束的细胞靶向和内吞 由于肿瘤细胞膜中的多药耐药 (multidrug resistance) 机制, 药物很难穿过细胞膜而进入细胞内起作用。利用

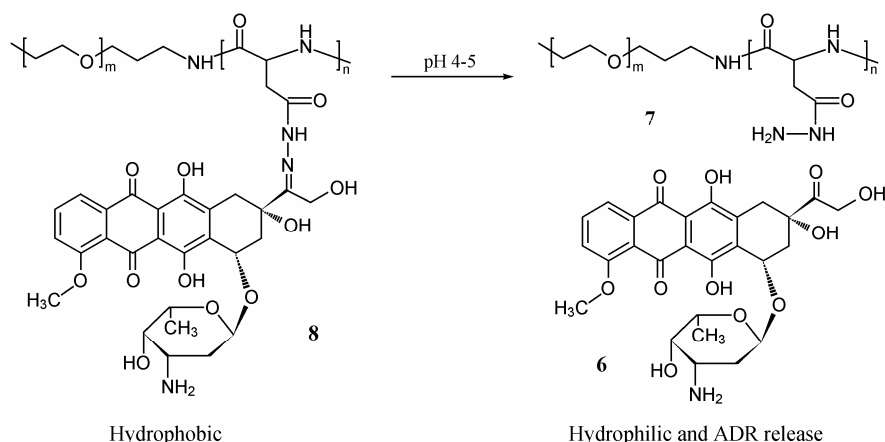


Figure 2 The hydrolysis of poly(ethylene glycol)-b-poly[aspartatehydrazone adriamycin(ADR)]

pH_E 激活胶束的肿瘤细胞靶向功能, 或者使胶束带正电荷, 可促进胶束的细胞内吞, 使胶束进入肿瘤组织后将药物直接输送到癌细胞内, 从而使药物避开肿瘤细胞膜中的抗药机制。

生物素 (biotin) 与细胞膜上的受体结合促进细胞内吞, 但该受体在正常细胞膜上也有表达。Lee 等^[39] 制备了 pH_E 响应的肿瘤靶向胶束 (图 3), 使生物素只有到达肿瘤组织后才起作用。通过 PHis 将生物素连接到疏水的 PLLA 上, 形成了末端生物素功能化的 PLLA-b-PHis-biotin 的嵌段共聚物。再将其添加到嵌段共聚物 PHis-b-PEG 中共同组成胶束。在中性条件下, 由于 PHis 不溶于水, biotin 被包埋在 PEG 外壳内, 不能与细胞膜上的受体结合。在肿瘤的酸性 pH_E 下, PHis 变成水溶性的聚合物链, 由于 PHis 的伸展而使 biotin 出现在胶束的表面, 因而与癌细胞膜上的受体结合, 启动受体介导的细胞内吞, 将胶束内吞到细胞中。该作者最近还利用两种嵌段共聚物 PLLA-b-PEG-b-PHis-TAT (艾滋病病毒转录反式激活因子, transactivator of transcription) 和 PHis-b-PEG 制备了 pH_E 响应的肿瘤靶向纳米胶束, 并研究该胶束负载 DOX 药物的抗肿瘤性能, 发现用胶束负载药物不仅能抑制接种到裸鼠体内具有多药耐药性的人卵巢癌移植瘤 A2780/AD 的增长, 还能使肿瘤不断退化。相同条件下, 用药 3 周后该胶束负载药物治疗组动物肿瘤体积比直接使用 DOX 治疗组小 18 倍^[40]。

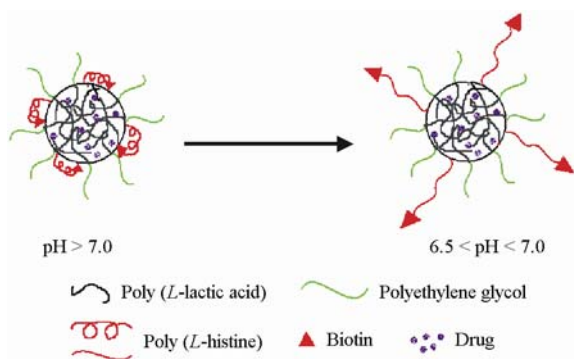


Figure 3 The pH-dependent biotin availability for binding. Above pH 7.0, biotin anchored on the micelle core via pH-sensitive PHis is shielded by PEG shell of the micelle. Biotin is exposed on the micelle surface at acidic conditions ($6.5 < \text{pH} < 7.0$) and can interact with cells, which facilitates biotin-receptor-mediated endocytosis^[39]

申有青等^[41] 研制了一种具有三层结构的 pH 响应纳米颗粒, 其结构及 pH 响应过程如图 4 所示。这种胶束由三元梳状聚合物 (化合物 9) 通过 pH 控制的逐步自组装制备。将聚合物溶于酸性溶液中, 得到

PCL 为内核、PEG 和质子化 PDEA 为外壳的胶束, 调整 pH 值至 7.4, 质子化的 PDEA 去质子化变得疏水。而在 PCL 内核外形成另一疏水层, PEG 链形成亲水外壳。在正常组织的中性条件下, 该胶束不带电荷。当胶束进入肿瘤组织后, 在 pH_E 酸性条件下 PDEA 质子化, 使整个胶束带正电荷。带正电的胶束通过静电吸引作用而吸附到带负电的细胞膜上, 使胶束被快速内吞到细胞内。利用激光共聚焦显微镜观察发现, 在 pH 6.0 时大量胶束吸附在细胞膜上, 而在 pH 7.0 时, 细胞膜上几乎没有胶束。利用流式细胞仪检测胶束的内吞也表明, 在酸性条件下细胞摄取胶束的速度比在碱性条件下明显加快。

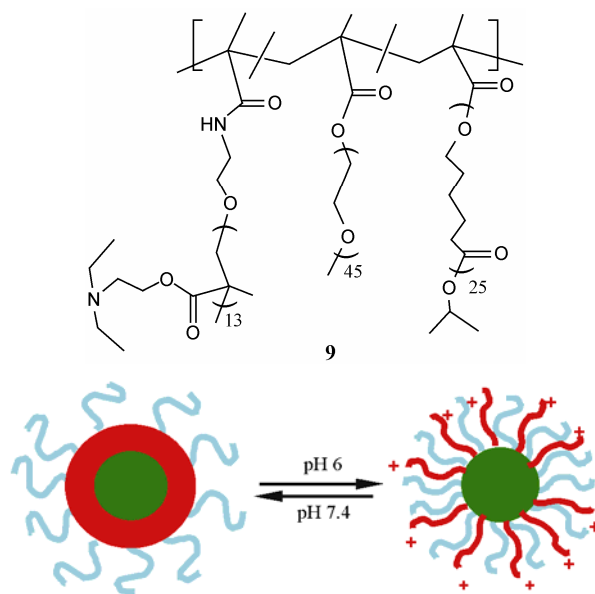


Figure 4 The pH-responsive three layer nanoparticles^[41]

4.3 溶酶体 pH_L 响应的聚合物胶束用于细胞内药物输送 载药胶束进入细胞内, 先后进入内涵体和溶酶体。载体如果不能及时从内涵体和溶酶体内逃出, 所载的药物就会被释放到溶酶体中。溶酶体的酸性环境对弱碱性的药物有蓄积作用, 也可能使药物分解而失去活性^[42]。因此, 进入溶酶体的载体或药物必须尽快从溶酶体中逃出, 以释放药物到细胞质溶质中。利用 pH_L 响应胶束可成功地实现药物或载体快速逃逸出溶酶体。这种用于细胞质溶质药物输送的 pH 响应胶束必须在肿瘤组织的弱酸环境中保持稳定, 而只有进入 pH 更低的溶酶体中, 才能发生响应。其中, 带胺基的聚合物在溶酶体中具有“质子海绵”作用 (proton-sponge effect)。在溶酶体中, 聚合物的胺基质子化而使其 pH 升高, 因而溶酶体的质子泵不断泵入质子的同时, 也带入阴离子, 使溶酶体内电解质浓度

升高导致渗透压增加,引起溶酶体膨胀,最后导致溶酶体膜破裂,而将药物或载体释放到细胞质溶质中^[43]。Lee等^[44]使用 PHis-PEG (75%) 和 PLLA-PEG-folate (叶酸) (25%) 制备了能够响应 pH_L 的胶束。以不具有 pH_L 响应功能的 PLLA-PEG-folate 胶束作为对照,比较了它们在多药耐药性的人乳腺癌 MCF-7 细胞及其异种移植瘤即体外和体内实验中的药物输运行为和抗肿瘤能力。利用激光共聚焦显微镜研究发现, pH_L 响应胶束负载的 DOX 均匀地分散在细胞质溶质和细胞核内,而不具有 pH_L 响应的胶束负载的 DOX 却被包埋在溶酶体和多泡体 (multivesicular body) 中。这一现象表明 PHis 能够在 pH_L 下质子化,通过“质子海绵”作用,破坏溶酶体膜,释放药物到细胞质溶质中。体内和体外实验表明,该 pH_L 响应的胶束负载的 DOX 显著提高抗癌活性^[44]。Kim等^[45]还研究了该胶束对多药耐药性的卵巢癌的抗肿瘤效果,发现该胶束能有效地抑制多药耐药性卵巢癌的生长。

由于肿瘤细胞内有多种清除细胞内药物的机制,当药物从载体缓慢释放到细胞内时,细胞质溶质中的药物很难积累到有效的浓度。Xu等^[46]提出了通过快速药物释放来饱和肿瘤细胞内抗药机制的设想。当纳米载体进入细胞后,立即释放携带的所有药物分子到细胞质溶质中,使细胞中药物分子的量瞬时超过细胞内所有抗药机制的清除能力,从而使细胞内的药物浓度达到或超过有效药物浓度而有效地诱导细胞凋亡。利用原子转移自由基聚合 (atom transfer radical polymerization, ATRP) 合成了 PDEA-b-PEG 嵌段共聚物。在中性溶液中 PDEA 段疏水,该嵌段共聚物形成 100 nm 左右的胶束。在溶酶体中,这种胶束的 PDEA 链段质子化后溶于水,导致胶束溶解,将携带的药物释放到溶酶体中。同时, PDEA 的胺基质子化,引发“质子海绵”作用,使溶酶体破裂,将溶酶体内的药物快速释放到细胞质溶质中。细胞质溶质中的大量的药物分子有可能超过细胞的药物清除能力,因而可能达到有效的药物浓度。通过比较 PDEA-b-PEG 胶束负载的顺铂与直接使用顺铂及不具有 pH 响应功能的 PCL-b-PEG 胶束负载的顺铂的细胞毒性,发现用 PDEA-b-PEG 胶束负载顺铂的细胞毒性明显高于后两种给药方法的细胞毒性。利用腹腔内移植卵巢癌的裸鼠作为动物模型进行了抗肿瘤活性研究,发现 PDEA-b-PEG 胶束负载的顺铂能更有效地引起癌细胞的凋亡,减少腹腔内肿瘤的数目,因而具有更高的抗肿瘤活性^[46]。

除了利用能质子化的叔胺聚合物外,一些带酸

敏感基团的聚合物也被用来制备溶酶体 pH_L 响应的胶束。这种胶束中疏水部分的酸敏感基团在溶酶体的 pH_L 下水解变成亲水部分,使胶束溶解,释放出所负载的药物。Gillies等^[31, 32]利用 PEG 和疏水的树枝状聚合物构成的共聚物制备了胶束。其中,疏水部分由亲水型树枝状聚合物中的羟基与 2,4,6-三甲氧基苯甲醛反应形成缩醛而制备。在 pH 7.4 时该缩醛保持稳定,但在溶酶体 pH_L 下,能快速水解,使疏水链段还原为亲水链段,从而释放出 DOX。Griset等^[47]发明了一种 pH_L 响应的可膨胀的胶束负载 PTX,在很低的剂量下该载药胶束可以完全抑制肿瘤的增长。

4.4 溶酶体 pH_L 响应的聚合物胶束用于细胞核药物输送 大部分抗癌药物,如顺铂和蒽环类抗生素,都是通过破坏细胞核内的 DNA 或者抑制拓扑异构酶而引起细胞凋亡^[48, 49]。然而在耐药性肿瘤细胞内,存在多种限制药物进入细胞核的耐药机制。因此,若将药物直接输送到细胞核,可使药物绕开细胞内的各种耐药机制,从而达到克服肿瘤细胞耐药性的目的。文献中细胞核靶向的药物输送大都通过使用核定位信号来实现。核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 主要是带正电的碱性多肽,它们具有快速细胞核定位的功能,可引领药物或其他分子穿过核膜进入细胞核,但这些核定位信号在体内没有选择性。若将具有核定位能力的 TAT 多肽的融合蛋白注射到小鼠腹腔后,发现在所有组织包括大脑中都含有这种具有生物活性的融合蛋白^[50]。因此 NLS 必须经过化学修饰才有望应用于临床。

Sethuraman等^[51]发明了一种肿瘤 pH_L 激活 TAT 核定位功能的方法。PLLA-b-PEG-TAT 聚合物形成表面含有 TAT 的胶束,然后加入 pH 敏感的聚甲基丙烯酸酞磺胺二甲氧基嘧啶 [poly(methacryloyl sulfadimethoxine), PSD]-b-PEG 共聚物。在 pH 7.4 下,带负电的 PSD 能与带正电的 TAT 紧密结合,起到屏蔽 TAT 的作用。因此,该胶束可以在血液中稳定。但在酸性条件下, PSD 发生质子化而不带电荷,与 TAT 分离,从而裸露出 TAT 以发挥其穿膜和核定位功能。在肿瘤组织中,弱酸性的 pH_E 使部分 TAT 裸露, TAT 帮助胶束穿过细胞膜,进入细胞内。然后在 pH_L 下更多的 TAT 被裸露出来,引导胶束快速穿过核膜进入细胞核。流式细胞技术和激光共聚焦显微技术都证明细胞在 pH 6.6 时比在 pH 7.4 时摄取更多的胶束,并且胶束能够在核膜上聚集。

除了 NLS 外,带正电荷的聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI)、聚赖氨酸、聚酰胺-胺树枝状大分



Figure 5 A targeted charge-reversal nanoparticle and its pH-triggered charge-reversal^[33]. PCL: Polycaprolactone; PEI: Polyethyleneimine; FA: Folate

子等也能够靶向细胞核^[52],但这些带正电荷的聚合物能激活 RES 识别系统,很快从血液循环系统中被清除出去,甚至导致凝血反应^[53]。因此不能直接用于临床。Xu 等^[33]研制了一种能在酸性 pH 下实现从负电荷到正电荷转变的胶束,使其在肿瘤组织中能快速被摄取并靶向细胞核。聚合物的结构如图 5 所示,PCL-PEI 共聚物中 PEI 的一些氨基被酰胺化为带负电荷的 β -羧基酰胺。该 β -羧基酰胺在中性条件下稳定,而在酸性条件下能快速水解为原来的氨基,再生成带正电的 PEI,实现胶束从带负电荷到正电荷的转变。在 pH 7.4 时这种胶束的 zeta 电位为 -20 mV,因而不会与带负电的细胞作用。当胶束通过 EPR 作用进入肿瘤组织后,弱酸性的 pH_E 使 β -羧基酰胺部分水解,再生部分 PEI,导致胶束带部分正电荷(在 pH 6.0 时,胶束 zeta 电位变为 $+8$ mV),与靶向基团叶酸一起促进胶束穿过细胞膜,进入细胞内。胶束经过内涵体进入溶酶体后,在较强弱酸性的 pH_L 下, β -羧基酰胺快速水解再生 PEI,胶束表面带强正电荷。带正电荷的胶束可使溶酶体破裂,胶束逃逸出来,并最终进入细胞核。通过激光共聚焦显微镜发现,该胶束与细胞培养 12 h 后,细胞核内有胶束进入;培养 24 h 后,一半以上的细胞核内含有载药的胶束。体外实验表明这种胶束输送的 DOX 对肿瘤细胞有很高的细胞毒性,其 IC₅₀ 是小分子 DOX 的 1/7。

5 结语

肿瘤组织内存在多种抗药机制,这是导致肿瘤化疗失败及病人死亡的主要原因。目前临床上还没有克服肿瘤抗药性的药物和方法。利用肿瘤 pH 响应的胶束输送抗癌药物,通过促进细胞内吞、药物快速释放、细胞核定位,明显增加药物在作用部位如细胞质和细胞核中的浓度,饱和癌细胞的多种抗药机制,从而克服肿瘤的耐药性,提高抗癌药物的药效并减少其毒副作用,为癌症的靶向治疗提供了新的途径。该方法可以促进药物载体靶向肿瘤细胞,加快细胞内吞,实现快速药物释放以及靶向细胞内的细胞器。但是,目前仍然缺乏能对肿瘤 pH 做出精确反应的体系,尤其能够靶向细胞核的胶束还有待进一步开发。胶束

在细胞内的传输机制仍不完全清楚。实现肿瘤 pH 响应的胶束在临床上的应用,仍需进行大量的工作。

References

- [1] Yu SZ. Anti-cancer strategies of WHO [J]. China Cancer (中国肿瘤), 2009, 18: 88–99.
- [2] Pinzani V, Bressolle F, Hang JJ, et al. Cisplatin-induced renal toxicity and toxicity-modulating strategies: a review [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1994, 35: 1–9.
- [3] Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance [J]. Annu Rev Med, 2002, 53: 615–627.
- [4] Islam T, Josephson L. Current state and future applications of active targeting in malignancies using superparamagnetic iron oxide nanoparticles [J]. Cancer Biomark, 2009, 5: 99–107.
- [5] Sun Y, Wang C. Advances in the study of small peptides in targeted drug delivery system [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 992–996.
- [6] Das M, Mohanty C, Sahoo SK. Ligand-based targeted therapy for cancer tissue [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2009, 6: 285–304.
- [7] Kwon GS. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds [J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2003, 20: 357–403.
- [8] Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 47: 113–131.
- [9] Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Longcirculating and target-specific nanoparticles: theory to practice [J]. Pharmacol Rev, 2001, 53: 283–318.
- [10] Sutton D, Nasongkla N, Blanco E, et al. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery [J]. Pharm Res, 2007, 24: 1029–1046.
- [11] Guo M, Yan Y, Zhang HK, et al. Magnetic and pH-responsive nanocarriers with multilayer core-shell architecture for anti-cancer drug delivery [J]. J Mater Chem, 2008, 18: 5104–5112.
- [12] You J, Li X, Cui FD, et al. Folate-conjugated polymer micelles for active targeting to cancer cells: preparation, *in vitro* evaluation of targeting ability and cytotoxicity [J].

- Nanotechnology, 2008, 19, 045102.
- [13] Rapoport N. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery [J]. Prog Polym Sci, 2007, 32: 962–990.
- [14] Lee ES, Gao ZG, Bae YH. Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology [J]. J Control Release, 2008, 132: 164–170.
- [15] Stubbs M, McSheehy PMJ, Griffiths JR, et al. Causes and consequences of tumor acidity and implications for treatment [J]. Mol Med Today, 2000, 6: 15–19.
- [16] Martin GR, Jain RK. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy [J]. Cancer Res, 1994, 54: 5670–5674.
- [17] Murphy RF, Powers S, Cantor CR. Endosome pH measured in single cells by dual fluorescence flow cytometry: rapid acidification of insulin to pH 6 [J]. J Cell Biol, 1984, 98: 1757–1762.
- [18] Killisch I, Steinlein P, Romisch K, et al. Characterization of early and late endocytic compartments of the transferrin cycle: transferrin receptor antibody blocks erythroid differentiation by trapping the receptor in the early endosome [J]. J Cell Sci, 1992, 103: 211–232.
- [19] Schmid S, Fuchs R, Kielian M, et al. Acidification of endosome subpopulations in wild-type Chinese hamster ovary cells and temperature-sensitive acidification-defective mutants [J]. J Cell Biol, 1989, 108: 1291–1300.
- [20] Steinman RM, Mellman IS, Muller WA, et al. Endocytosis and the recycling of plasma membrane [J]. J Cell Biol, 1983, 96: 1–27.
- [21] Fisher OZ, Kim Timothy, Dietz SR, et al. Enhanced core hydrophobicity, functionalization and cell penetration of polybasic nanomatrices [J]. Pharm Res, 2009, 26: 51–60.
- [22] Atkin R, Bradley M, Vincent B. Core-shell particles having silica cores and pH-responsive poly(vinylpyridine) shells [J]. Soft Matter, 2005, 1: 160–165.
- [23] Oh KT, Lee ES. Cancer-associated pH-responsive tetracopolymeric micelles composed of poly(ethylene glycol)-b-poly(L-histidine)-b-poly(L-lactic acid)-b-poly(ethylene glycol) [J]. Polym Adv Technol, 2008, 19: 1907–1913.
- [24] Shen YQ, Tang HD, Zhan YH, et al. Degradable poly(β -amino ester) nanoparticles for cancer cytoplasmic drug delivery [J]. Nanomedicine, 2009, 5: 192–201.
- [25] Saito R, Yamaguchi K, Hara T, et al. Interaction between methylene blue and cyclic methacrylic acid oligomer [J]. Macromolecules, 2007, 40: 4621–4625.
- [26] Zhang L, Guo R, Yang M, et al. Thermo and pH dual-responsive nanoparticles for anti-cancer drug delivery [J]. Adv Mater, 2007, 19: 2988–2992.
- [27] Kusonwiriawong C, van de Wetering P, Hubbell JA, et al. Evaluation of pH-dependent membrane-disruptive properties of poly(acrylic acid) derived polymers [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2003, 56: 237–246.
- [28] Hao TN, Qiao MX, Li Z, et al. Progress in the study of pH and temperature sensitive biodegradable block copolymers [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 123–127.
- [29] Bae Y, Fukushima S, Harada A, et al. Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change [J]. Angew Chem Int Ed, 2003, 42: 4640–4643.
- [30] Bae Y, Nishiyama N, Fukushima S, et al. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced *in vivo* antitumor efficacy [J]. Bioconjugate Chem, 2005, 16: 122–130.
- [31] Gillies ER, Frechet JMJ. pH-responsive copolymer assemblies for controlled release of doxorubicin [J]. Bioconjugate Chem, 2005, 16: 361–368.
- [32] Gillies ER, Jonsson TB, Frechet JMJ. Stimuli-responsive supramolecular assemblies of linear-dendritic copolymers [J]. J Am Chem Soc, 2004, 126: 11936–11943.
- [33] Xu PS, Van Kirk EA, Zhan YH, et al. Targeted charge reversal nanoparticles for nuclear drug delivery [J]. Angew Chem (Int Ed Engl), 2007, 46: 4999–5002.
- [34] Huang XN, Du FS, Cheng J, et al. Acid-sensitive polymeric micelles based on thermoresponsive block copolymers with pendent cyclic orthoester groups [J]. Macromolecules, 2009, 42: 783–790.
- [35] Lee ES, Shin HJ, Na K, et al. Poly(L-histidine)-PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization targeted charge reversal nanoparticles for nuclear drug delivery [J]. J Control Release, 2003, 90: 363–374.
- [36] Lee ES, Na K, Bae YH. Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting [J]. J Control Release, 2003, 91: 103–113.
- [37] Gao ZG, Lee DH, Kim DI, et al. Doxorubicin loaded pH-sensitive micelle targeting acidic extracellular pH of human ovarian A2780 tumor in mice [J]. J Drug Target, 2005, 13: 391–397.
- [38] Ko J, Park K, Kim YS, et al. Tumoral acidic extracellular pH targeting of pH-responsive MPEG-poly([β]-amino ester) block copolymer micelles for cancer therapy [J]. J Control Release, 2007, 123: 109–115.

- [39] Lee ES, Na K, Bae YH. Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle [J]. *Nano Lett*, 2005, 5: 325–329.
- [40] Lee ES, Gao ZG, Kim D, et al. Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pH specific TAT exposure and multidrug resistance [J]. *J Control Release*, 2008, 129: 228–236.
- [41] Shen YQ, Zhan YH, Tang JB, et al. Multifunctioning pH-responsive nanoparticles from hierarchical self-assembly of polymer brush for cancer drug delivery [J]. *AIChE J*, 2008, 54: 2979–2989.
- [42] Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59: 748–758.
- [43] Hu Y, Litwin T, Nagaraja AR, et al. Cytosolic delivery of membrane-impermeable molecules in dendritic cells using pH-responsive core-shell nanoparticles [J]. *Nano Lett*, 2007, 7: 3056–3064.
- [44] Lee ES, Na K, Bae YH. Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor [J]. *J Control Release*, 2005, 103: 405–418.
- [45] Kim D, Lee ES, Park K, et al. Doxorubicin Loaded pH-sensitive micelle: antitumoral efficacy against ovarian A2780/DOXR tumor [J]. *Pharma Res*, 2008, 25: 2074–2082.
- [46] Xu PS, Van Kirk EA, Murdoch WJ, et al. Anticancer efficacies of cisplatin-releasing pH-responsive nanoparticles [J]. *Bio-macromolecules*, 2006, 7: 829–835.
- [47] Griset AP, Walpole J, Liu R, et al. Expansile nanoparticles: synthesis, characterization, and *in vivo* efficacy of an acid-responsive polymeric drug delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 2469–2471.
- [48] Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, et al. Molecular pharmacology of cisplatin: from cellular damage to apoptosis induction [J]. *Recent Res Develop Mol Pharmacol*, 2002, 1: 37–51.
- [49] Morjani H, Millot JM, Belhoussine R, et al. Anthracycline subcellular distribution in human leukemic cells by microspectrofluorometry: factors contributing to drug-induced cell death and reversal of multidrug resistance [J]. *Leukemia*, 1997, 11: 1170–1179.
- [50] Trehin R, Merkle HP. Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58: 209–223.
- [51] Sethuraman VA, Bae YH. TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors [J]. *J Control Release*, 2007, 118: 216–224.
- [52] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 5177–5181.
- [53] Verbaan FJ, Oussoren C, van Dam IM, et al. The fate of poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)-based polyplexes after intravenous administration [J]. *Int J Pharm*, 2001, 214: 99–101.